

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-72875

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)3月13日

C 12 N 9/08
//C 12 N 9/08
C 12 R 1:645)

7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑭ 発明の名称 リグニンパーオキシターゼFLおよびその製造方法

⑰ 特 願 昭63-224499

⑱ 出 願 昭63(1988)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月15日、社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌62巻3号」に発表

⑲ 発 明 者	桑 原	正 章	香川県高松市下田井町620-1
⑲ 発 明 者	麻 田	恭 彦	香川県木田郡三木町池戸2750-1
⑲ 発 明 者	凌	楓	京都府宇治市五ヶ庄新開9-1
⑲ 発 明 者	打 越	正 延	香川県木田郡三木町平木463-1
⑳ 出 願 人	王子製紙株式会社		東京都中央区銀座4丁目7番5号
㉑ 代 理 人	弁理士 平木 祐輔		外1名

明 細 書

1. 発明の名称

リグニンパーオキシターゼFLおよびその製造方法

2. 特許請求の範囲

1) 下記の性質を有するリグニンパーオキシターゼFL

(1) 作用

① 過酸化水素存在下でベラトリルアルコールを酸化してベラトリルアルデヒドを生成する。

② 過酸化水素存在下でジアリルプロパンを酸化的に分解する。

(2) 基質特異性

ジアリルプロパンおよびベラトリルグリセロール-β-グアシルエーテル等リグニンの2量体モデル化合物を酸化的に分解する。またベラトリルアルコールを酸化する。

(3) 至適 pH および pH 安定性

pH 3 付近でベラトリルアルコールを酸化

する作用が至適であり、pH 3.5 ないし 7 の範囲で安定である。

(4) 至適温度および熱安定性

25℃ 付近でベラトリルアルコールを酸化する作用が至適であり、55℃ までの熱に安定である。

(5) 等電点は 4.8 付近である。

(6) 本酵素の分子量は約 42,000 である。

(SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による。)

(7) 本酵素は FeSO₄、CuSO₄ により弱く阻害を受け、EDTA、KCN、ジチオスレイトール、ヒドロキシルアミン、チオウレア、NaN₃、で強く阻害される。

(8) 本酵素はヘム含有酵素であり、407nm 付近に極大吸収をもつ。

(9) 本酵素の作用には過酸化水素を必要とする。

2) ファネロケーテ属に属し、請求項1)記載のリグニンパーオキシターゼFL生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物からリグニンパー

オキシダーゼF₁を採取することを特徴とする
リグニンパーオキシダーゼF₁の製造方法

- 3) ファネロケーテ属に属する微生物がファネロケーテ・クリソスポリウム(*Phanerochaete chrysosporium*)属に属し、以下の菌学的性質を有する変異株であることを特徴とする請求項2)記載の製造方法。
 - (1) 高濃度窒素源およびα-ジアニシジンを含む培地で培養すると赤褐色色素を生成する。
 - (2) 気相の酸素分圧を空気より高めることなく培養して、リグニンパーオキシダーゼF₁を生産する。
 - (3) 高濃度窒素源を含む培地で培養してリグニンパーオキシダーゼF₁を生産する。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はリグニンパーオキシダーゼF₁およびその製造方法に関するものである。本発明の酵素はリグニンに作用して、これを低分子化または分解する性質を有するため、木材等のリグノセルロ

質に作用させ、リグニンのみを選択的に分解させようとする試みがなされている (Science, 221, 661-662(1983))。

この報告は、主としてリグニンモデル化合物を基質としたものであるが、世界で最初にリグニン分解酵素を単離、精製したものである。この酵素はファネロケーテ・クリソスポリウムが生産する菌体外酵素であり、主な特徴は鉄含有酵素であること、分子量が約42,000であること、酵素作用に過酸化水素が必要であること、リグニンモデル化合物の4位のフェノール性水酸基がメトキシル基になった化合物に対して作用することが確認されていること等である。さらにファネロケーテ・クリソスポリウムが生産する菌体外酵素としては、2つの酵素が報告されている (FEBS Lett., 169, 247-250(1984))。

これらの酵素の1つは分子量が41,000以下であること、もう1つの酵素は分子量が46,000以下であること、さらにいずれの酵素も鉄含有酵素であると推定されていること、酵素作用に過酸化水素

ース材料を原料とする紙パルプ製造工程における種々の工程で利用できる。すなわちパルプ化工程、パルプ漂白工程、排水処理工程などにおけるリグニンの低分子化または分解を行わせることに利用できる。さらに木材の糖化において、糖化の前段の処理としてリグニンを分解することによって、セルラーゼ作用を高めるといいうゆるセルロース系バイオマス利用の分野にも適用できる。

(従来技術)

木材等のリグノセルロース物質に白色腐朽菌を接種、培養することによってリグニンを分解し、セルロースパルプを製造する試みがなされている (特開昭50-46903号公報参照)。しかし、この方法の白色腐朽菌は共存する炭水化物をも分解してしまい、またセルラーゼ欠損変異株を用いた場合には、本来のリグニン分解力が弱まってしまうこと等の問題点があり、実用化されるに至っていない。

一方、このような問題点を解決するため、白色腐朽菌のリグニン分解酵素をリグノセルロース物

が必要であること、リグニンモデル化合物の4位のフェノール性水酸基がエトキシル基になった化合物に対して作用することが確認されていること等である。

また、Leisola らは、ファネロケーテ・クリソスポリウムの培養上清をクロマトフォーカシングによって分離、分析しているが、4つの等電点の異なるリグニンパーオキシダーゼを検出した。これらの酵素の等電点は4.5, 3.5, 3.4, 3.2であり、5以上のものはなく、分子量は39,000~42,000の間であった (J. Biotechnol., 2, 379-382 (1985))。

一方、カワラタケ属の担子菌が生産するリグニン分解酵素 (特開昭61-92568号) の主な特徴は銅含有酵素であること、等電点が3.5付近であること、酵素作用に酸素が必要であること、分子量が約53,000であること、リグニンモデル化合物の4位のフェノール性水酸基がメトキシルになった化合物に対して作用しないこと等であり、前記のファネロケーテ・クリソスポリウムの生産する菌体外酵素とは全く性質が異なる酵素である。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明では白色腐朽菌をリグノセルロース物質に作用させるときに生ずるリグニンの分解の他に共存する炭水化物の分解を起こすという問題点を解決することを意図するものであり、主としてリグノセルロース物質中のリグニンを低分子化または分解する新規酵素およびその製造方法を提供することにある。

リグニンを低分子化する酵素の供給を実用化する場合、製造方法が容易であることが重要な要件となる。

本発明の目的はこのような要件を満たす新規酵素およびその製造方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は新規なりグニンパーオキシダーゼF Lおよびその製造方法に関するものである。

本発明者らはリグニン分解菌としてよく研究されているファネロケーテ・クリソスポリウムのリグニン分解酵素活性の強い変異株について鋭意研究を行った結果、該菌株を増殖せしめ、その培養

物から得た菌体外粗酵素をイオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより高度に精製し、従来知られたリグニンパーオキシダーゼと異なる新規な該酵素標品を得て、本発明に到達した。

すなわち、本発明は下記の性質を有する新規なりグニンパーオキシダーゼF Lおよびその製造方法に関する。

(1) 作用

① 過酸化水素存在下でベラトリルアルコールを酸化してベラトリルアルデヒドを生成する。

② 過酸化水素存在下でジアリルプロパンを酸化的に分解する。

(2) 基質特異性

ジアリルプロパンおよびベラトリルグリセロール-β-グアヤシルエーテル等リグニンの2量体モデル化合物を酸化的に分解する。

またベラトリルアルコール酸化する。

(3) 至適 pH および pH 安定性

pH 3 付近でベラトリルアルコールを酸化する作用が至適であり、pH 3.5 ないし 7 の範囲で安定である。

(4) 至適温度および熱安定性

25℃ 付近でベラトリルアルコールを酸化する作用が至適であり、55℃ までの熱に安定である。

(5) 等電点は 4.8 付近である。

(6) 本酵素の分子量は約 42,000 である。

(SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による。)

(7) 本酵素は FeSO_4 、 CuSO_4 により弱く阻害を受け、EDTA、KCN、ジチオスレイトール、ヒドロキシルアミン、 NaN_3 、チオウレアで強く阻害される。

(8) 本酵素はヘム含有酵素であり、407nm 付近に極大吸収をもつ。

(9) 本酵素の作用には過酸化水素を必要とする。
本酵素の力価測定はベラトリルアルコールを基質として下記の第 1 表に示した反応液中 30℃ で酵

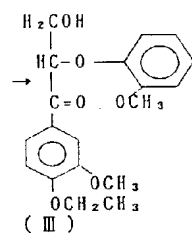
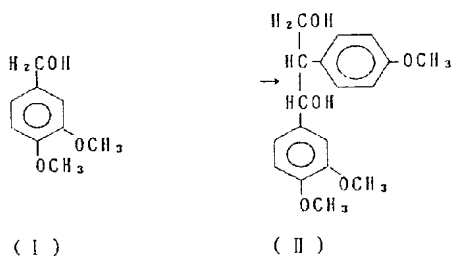
素を作用せしめ、生成するベラトリルアルデヒドの紫外吸収値を 310nm で経時的に記録測定して行う。1 分間に 1 nmol 生成せしめる酵素量を 1 単位とする。

第 1 表 酵素力価測定のための反応液組成

5 mM ベラトリルアルコール	0.1 ml
0.5M 酒石酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0)	0.2 ml
5.4 mM 過酸化水素	0.1 ml
酵 素 液	0.6 ml

本酵素はリグニンのモデル化合物としてよく用いられるベラトリルアルコール (I)、ジアリルプロパン (II)、β-O-4 ダイマーモデル化合物 (III) に作用して、ベラトリルアルコールをベラトリルアルデヒドに酸化し、またジアリルプロパンおよび β-O-4 ダイマーモデル化合物は以下に示したようにプロパンの α、β 炭素結合を酸化的に切断する。

以上のように本発明の酵素の作用機序は従来より知られているリグニンパーオキシダーゼの作用機序となんら変るものではない。



→印は切断部位を示す

色素の分解速度の速いコロニーを拾うことによって、野生株では酵素生産できないような高い窒素濃度の培地でリグニンパーオキシダーゼを生産する株を得ることができる。かくして得られた株を第2表に示すカークの培地で、培養容器に酸素を吹き込むことなしに静置培養し、培養液のリグニンパーオキシダーゼ活性の高い株を選抜することにより、目的の変異株を得ることができる。

本発明に用いる微生物としてはファネロケーテ・クリソスポリウムに属し、リグニンパーオキシダーゼF_Lを生産する能力のある微生物であればいずれも用いることができるが、以下の菌学的性質を示すファネロケーテ・クリソスポリウムが特に適しており、ファネロケーテ・クリソスポリウムME446に由来する変異株であるファネロケーテ・クリソスポリウムFL-21株が例示される。

なお、この微生物を工業技術院微生物工業技術研究所に寄託申請したが、その受託が拒否された。

(I) 高濃度窒素源および0-ジアニシジンを含む培地で培養すると赤褐色色素を生成する。

本発明の酵素はファネロケーテ属に属するリグニンパーオキシダーゼF_L生産菌を培地に培養することにより製造されるが、好ましくはファネロケーテ・クリソスポリウムに属し、高窒素条件下(60mM)の培地で培養器内の気相の酸素分圧を空気より高めることなく培養することにより、培養液中にリグニン分解酵素を生産する能力のある変異株を、上記の方法で培養し、培養物から該酵素を採取することによって得られる。

本発明に用いる変異株は以下のようにして得ることができる。

まず、ファネロケーテ・クリソスポリウムの孢子懸濁液に紫外線を照射し、生存率が0.1~1%となるように処理することによって変異の誘導を行う。次いで、第2表に示すカークの培地に0.05%のレマズールブリリアントブルーR、および60mMの酒石酸アンモニウムを含有させた培地に紫外線処理した孢子をまき、37℃で培養すると、野生株は色素を分解しないが、変異株は色素を分解するためコロニーの周りがオレンジ色に変わる。この

(2) 気相の酸素分圧を空気より高めることなく培養して、リグニンパーオキシダーゼF_Lを生産する。

(3) 高濃度窒素源を含む培地で培養してリグニンパーオキシダーゼF_Lを生産する。

本発明で使用する培地としては、下記第2表のカーク(Kirk)の培地が代表的である。

第2表 カークの培地

(1ℓ中)	
ぶどう糖	20g
ペプトン	6.2g
酵母エキス	200mg
Kirk's salts*	10ml
0.4M ジメチルこはく酸-	
ナトリウム緩衝液(pH 4.5)	40ml

(本頁以下余白)

*Kirk's salts

(1 ℓ 中)	
KH_2PO_4	20 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
塩酸チアミン	10 mg
ニトリロ三酢酸	150 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50 mg
NaCl	100 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
CoSO_4	10 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg
ZnSO_4	10 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	1 mg
H_3BO_3	1 mg
NaMoO_4	1 mg

例えば陰イオン交換体によるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過等で行うが、もちろんこれらの方法を繰り返すこと、他の常法の精製手段を必要に応じ組み合わせることもできる。

なお、本発明の酵素は従来より知られているファネロケーテ・クリソスポリウムME446 のリグニンパーオキシダーゼおよび特願昭62-53847に開示されているリンゼニンパーオキシダーゼMF-1とは以下の点が異なっている。

- 1) 等電点：野生株ME446 の酵素は3以下であり、ATCC 24725株では4.5 以下特願昭62-53847の酵素(MF-1)は5.0-5.1 であるが、本発明の酵素は4.8 である。
- 2) 温度安定性：野生株ME446 の酵素は、55℃ 10分の処理で完全に失活し、特願昭62-53847の酵素(MF-1)は60℃でも100%活性を維持しており、65℃で完全に失活するが、本発明の酵素は55℃で85%の活性を維持しており、60℃では50%の活性が残っている。

培地中に添加する各成分の種類や量は必ずしも上記の組成に従う必要はないが、窒素源の濃度はアンモニア態窒素として10から60mMであることが望ましい。

リグニンパーオキシダーゼF L生産のための培養は以下のように行う。胞子を滅菌生理食塩水に懸濁し、窒素源として例えば0.62%ペプトン(Nとして60mM) 含むカークの培地に接種する。培養容器は綿栓など通気性のある栓で蓋をする。

野生株の培養のように酸素で培養容器内の気相を置換する必要はない。培養は静置培養で40℃以下で行うが、37℃程度が望ましい。3日目ないし8日目には培養液中にリグニンパーオキシダーゼF Lを検出することができる。変異株の活性は野生株に比べて最高約100 倍高い。

本発明の酵素は主として培養液中に分泌生産されるので、本酵素を採取するには培養終了後の培養物から菌体を濾過、遠心分離等の方法で除去した培養上清から、通常の酵素単離の方法により行うことができる。

- 3) pH安定性：野生株ME446 の酵素はpH 4-6 の範囲で安定であるが本酵素及び特願昭62-53847号の酵素(MF-1)は、3.5-7 の範囲で安定である。

実施例1

ファネロケーテ・クリソスポリウムFL-21株をマルトアガー(Difco 社製)のスラントに接種し、7日以上37℃に保温して胞子を十分に形成せしめた後、滅菌生理食塩水を加えて胞子懸濁液を作成し(約 10^7 個/cc)、6.2g/ℓのペプトンを含むカークの培地に培地容量の0.5%の胞子懸濁液を添加し、紙栓をして37℃に静置した。培養開始後5日目に培養を止め、以下の要領で酵素を採取した。酵素活性は1300単位/mlであった。

菌体をガーゼで濾過除去し、更に濾紙により除菌した培養液をエバポレーターにより30℃で濃縮、更に限外濾過(Amicon PM-10)により濃縮し、20 mMコハク酸緩衝液(pH 4.5)に対して透析した。

次いで20mMコハク酸緩衝液(pH 4.5)で平衡化したDEAE-セファロースCL-6B (Pharmacia社) カラ

ム(径1×4cm)に通した。野生株のリグニンパーオキシダーゼはおおむねこのカラムに吸着するのに対し、本発明の酵素は吸着せずに素通りした。

続いてこの素通り画分を限界濾過により濃縮した後、pH4.5の20mMこはく酸緩衝液に対し一夜透析し、該緩衝液で平衡化したHPLCカラム、TSK gel DEAE-5PW(東ソー社製)に通した。溶離条件は流速1ml/minとし、20mMこはく酸緩衝液(pH4.5)を、試料50-200μlを注入後3分間流し、90分かけて0-500mM食塩濃度勾配で溶出した。検出は280nmおよびヘム蛋白質の特異吸収407nmで行った。ほぼ素通りの3.8分(ピーク1)および5.8分(ピーク2)に活性のある2つの大きなピークがえられた。これら2つのピークの酵素活性の和は全体の9割を占めた。それぞれ20mMリン酸緩衝液(pH7)で平衡化したHPLCカラム、TSK-gel DEAE-5PW(7.5mm I.D.×7.5cm)にかけた。溶離条件は流速0.8ml/minとし、試料注入後6分間食塩を含まない20mMリン酸緩衝液(pH7)流した後4分で0から500mMの食塩の直線濃度勾配をかけ更に70分500mMを

保持した。ピーク1は28.5分、ピーク2は29分に溶出した。それぞれの活性画分を集め、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一の酵素に精製されていることを確認した。

アンホラインPAGプレートpH4-6.5(LKB社製)による等電点電気泳動の結果、ピーク1はpI5.01、ピーク2はpI4.80であり、ピーク1は特願昭62-53847の発明酵素に相当するものであった。

ピーク2の酵素は従来知られていない新規酵素であった。本酵素は100mlの培養濾液から収率19%で、0.79mgを得た。比活性は 21.9×10^3 単位/mgであった。

以下に本発明の性質について調べた。

(1) 作用機序

本酵素の作用機序を確認するために、リグニンモデル化合物として、ベラトリルアルコール(I)、ジアリルプロパン[1-(3',4'-ジメトキシフェニル)-1、3-ジヒドロキシ-2-(4"-メトキシフェニル)プロパン](II)、およびβ-O-4型ダイマー[1-(4'-エト

キシ-3'-メトキシフェニル)-2-(2'-メトキシフェノキシ)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン](III)を用いて試験を行った。

酵素反応は力価測定法の項で述べた組成の反応液中で行い、基質は終濃度が0.5mMとして、ベラトリルアルコールの代りに加えた。反応は30℃で5時間行い、反応終了後の反応液の酢酸エチル抽出液を薄層クロマトグラフィーで分析した。

薄層は蛍光剤を含むシリカゲルの薄層板(Merck社製、No. 5744)を用い、ジクロロメタン:メタノール(20:1(v/v))で展開した。同時に構造の明らかな標準試料を展開し、分解産物を展開し、分解産物を同定した。第1図に結果を示す。

ジアリルプロパンおよびベラトリルグリセロール-β-グアヤシルエーテルが酸化的に分解した際生ずる分解産物のスポットが観察できた。

またベラトリルアルコールが酸化した結果生

ずるベラトリルアルデヒドが観察できた。

(2) 至適pHおよびpH安定性

酒石酸ナトリウム緩衝液(pH4以下)、こはく酸ナトリウム緩衝液(pH4-6)、りん酸ナトリウム緩衝液(pH7-8)を用いた。

至適pHの結果は第2図に示す通りであって至適pHは3付近であった。

pH安定性は本発明の酵素を20mMの所定の緩衝液中で40℃、10分間保持し、活性を測定した。結果は第3図に示す通りであってpH3.5-7で安定であった。

(3) 至適温度および熱安定性

至適温度は温度条件を変えて本発明酵素の活性を測定した。その結果は第4図に示す通りであって、その至適温度は25℃であった。

熱安定性は20mMこはく酸緩衝液(pH4.5)中20~70℃の各温度で本発明酵素を10分間放置し、酵素活性を測定した。その結果は第5図に示す通りであって、本発明酵素は55℃まで安定であった。

(4) 等電点

アンホラインPAGプレートpH 4-6.5(LKB社製)による等電点電気泳動の結果4.80であった。

(5) 分子量

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定し約42,000であった。

(6) 種々の物質の影響

金属塩、阻害剤等種々の物質を反応液中に1mMの濃度で添加し、活性を測定した。結果は次に示す第3表の通りであった。

(本頁以下余白)

第3表 金属塩、阻害剤の影響

(濃度 1 mM)	FL	MF-1	野生株
コントロール	100	100	100
LiCl	112	117	92
KCl	87	102	101
NaCl	95	113	110
MnSO ₄	152	48	54
ZnCl ₂	91	99	89
CaCl ₂	69	109	105
MgSO ₄	123	87	103
HgCl ₂	124	96	99
EDTA	0	0	0
KCN	0	0	0
NaN ₃	0	0	0
メルカプトエタノール	0	0	0
チオウレア	0	0	0
ジチオスレイトール	16	89	80
ヒドロキシルアミン	3	0	0

* 特願昭62-53847号の発明の酵素

(7) 本酵素はヘム蛋白質の特徴である407nm付近の吸収があり、水溶液は褐色を呈する。

(8) 本酵素の作用には過酸化水素を必要とする。比較例1

野生株の酵素は、ME446株を窒素源濃度を1.2mMに抑えたカークの培地で3日置きに酸素ガスで培養容器内の気相を置換しながら培養せしめ、6-8日目の培養上清を実施例1と同様の方法で処理し、イオン交換カラムで精製した。培養濾液中の活性は8単位/mlであった。野生株の酵素は20mMこはく酸緩衝液(pH4.5)で緩衝化したDEAE-セファロース CL-6B(Pharmacia社)カラム(径1×4cm)全て吸着し、0-0.5Mの食塩濃度勾配で溶出すると、0.2M付近で溶出せしめられる主要画分が得られた。

該主要画分の酵素について実施例1と同様の方法でその性質を調べ、比較した。

至適pH、pH安定性、至適温度、熱安定性の結果をそれぞれ第2図、第3図、第4図、第5図に示した。

〔発明の効果〕

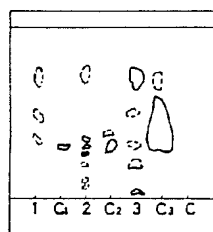
本発明により、従来より知られた酵素に比べて、製造方法が容易であり、マンガンイオンにより活性が促進されるリグニンパーオキシダーゼが発明され、実用上有利な酵素が供給できる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明酵素の作用機序、第2図は本発明酵素、野生株および特願昭62-53847号の酵素の至適pH、第3図は本発明酵素、野生株および特願昭62-53847号の酵素のpH安定性、第4図は本発明酵素、野生株および特願昭62-53847号の酵素の至適温度、第5図は本発明酵素、野生株および特願昭62-53847号の酵素の熱安定性を示すグラフである。

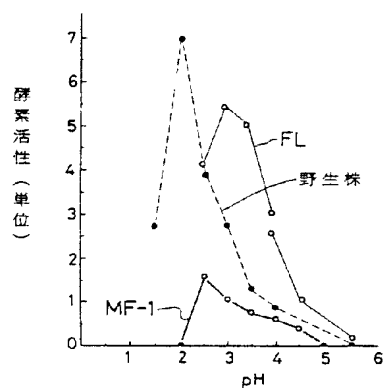
いずれの図においても、白抜き細線が本発明の酵素の結果を示し、黒塗り破線及び白抜き太線は比較例として行った野生株および特願昭62-53847号の酵素の結果を示す。

第 1 図

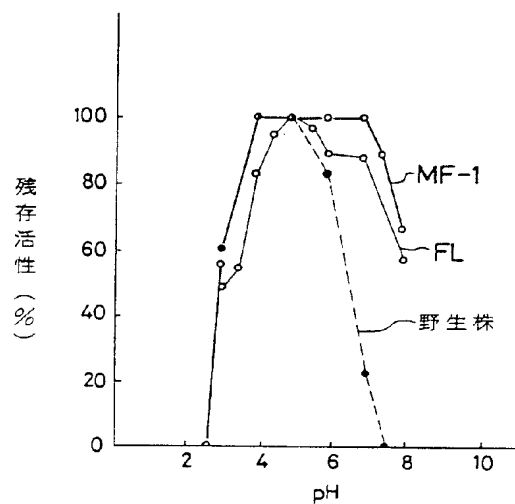


1. DAP(Ⅱ) ; C₁、コントロール(基質のみ)
2. B-O-4(Ⅲ) ; C₂、コントロール(基質のみ)
3. ペラトリルアルコール(Ⅰ) ; C₃
コントロール(基質のみ)
- C. 酵素

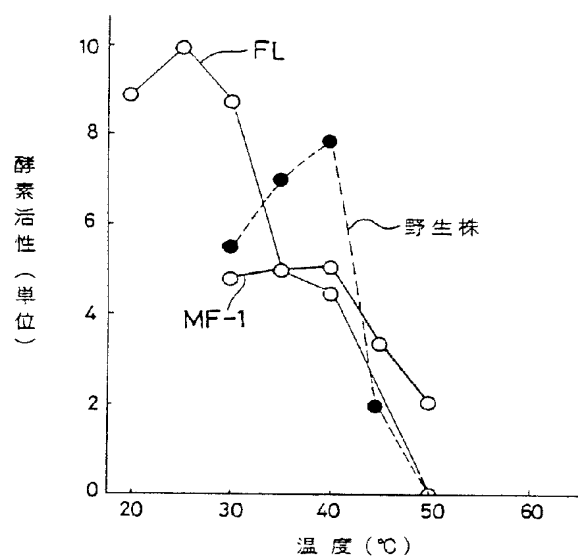
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

